

PEPTIDE HAVING FUNCTION TO SUPPRESS TRANSCRIPTION OF GENE

Patent number: JP2001269177
Publication date: 2001-10-02
Inventor: TAKAGI MASARU; SHINSHI HIDEAKI; OTA MASARU
Applicant: NATL INST OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY METI
Classification:
- international: C12N15/09; A01H5/00; C07K14/415; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10
- european:
Application number: JP20000087540 20000327
Priority number(s):

Abstract of JP2001269177

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a peptide derived from a higher plant having a function to bond to a DNA and suppress the transcription of gene, a gene coding for the peptide, a recombinant vector containing the gene and a transformant containing the recombinant vector.

SOLUTION: This invention relates to a peptide composed of the amino acid sequence (a) expressed by the sequence No.1 (refer to the specification) and a peptide composed of the amino acid sequence (a) wherein one or plural amino acids are deleted, substituted or added provided that the peptide has a function to suppress the transcription of the gene.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-269177

(P2001-269177A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-87540 (P2000-87540)

(22) 出願日 平成12年3月27日 (2000.3.27)

(71) 出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 高木 優

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術

院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 進士 秀明

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術

院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 太田 賢

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術

院生命工学工業技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド

(57) 【要約】

【課題】 DNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供する。

【解決手段】 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項2】 (a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項4】 請求項3に記載の遺伝子を含有する組み換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】植物ホルモン、エチレンに応答するシス制御エレメントに結合するタンパク質因子ERF (Ethylene Responsive Element binding Factor) は、ERFドメインと名付けたDNA結合ドメインを有する植物特有の転写因子である。最近の研究から、ERFタンパク質をコードする遺伝子は、マルチジーンファミリーを構成していることが明らかになっている。これまでに、タバコ、シロイヌナズナ植物からERFドメインを有するタンパク質因子をコードするcDNAが明らかにされているが、本発明者らはさらに、タバコ、イネ、シロイヌナズナのcDNAについて機能解析を行い、植物細胞内でリプレッサーとして機能するドメインを明らかにし、本発明を完成した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】すなわち、本発明はDNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、タバコ、イネ、シロイヌナズナのcDNAについて機能解析を行った結果、ERF因子のカルボキシ末端領域のアスパラギン酸-ロイシン-アスパラギン(DLN)からなるモチーフを有する領域が、遺伝子の転写を抑制する機能を有することを発見し、本発明を完成した。このようなD

LNモチーフを有し遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドとしては、例えばタバコ由来のERF3に含まれるペプチド；シロイヌナズナ由来のAtERF3 (配列番号1)、AtERF4、AtERF7及びAtERF8に含まれるペプチド；イネ由来のOsERF3に含まれるペプチドが挙げられる。

【0005】

【発明の実施の形態】機能解析の方法は、それぞれのERF因子をコードしているcDNAから、タンパク質コード領域を切り出し、これを酵母のGAL4転写因子のDNA結合ドメインをコードしている領域と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流につないでエフェクタープラスミドを構築する。これをGAL4タンパク質結合部位をプロモーター領域に結合した、ルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子と同時に、タバコ培養細胞あるいはシロイヌナズナ葉にエレクトロポーション法により導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって調べた。

【0006】つぎに、リプレッサー因子に存在するリプレッサー機能を有する領域であるリプレッサードメインを同定するために、各遺伝子のコード領域を削除する方法であるディリーション解析法を用いて、ERF因子のどの領域にリプレッサードメインが存在するのかを調べた。

【0007】

【実施例】アラビドプシス (和名シロイヌナズナ) AtERF3遺伝子の単離

(プローブの作成)すでに塩基配列が決定されているタバコのERF3遺伝子のcDNAをクローニングしたプラスミドpERF3を制限酵素EcoRIとNotIで消化し、アガロースゲル電気泳動でERF3のcDNAを含む950bpのDNA断片を単離した。このDNA断片約50ngを100℃で10分変性した後、DNAラベリングキット (アマシャムファルマシア社製Ready-To-Go DNA Labelling Beads)と5μLのアルファ32P-dCTP (アマシャムファルマシア社AA0005)をもちいて標識し、プローブを作成した。

【0008】(cDNAの作成とスクリーニング)アラビドプシス植物体から葉を採取し、液体窒素中でミキサーを用いて粉状に粉碎する。この粉碎した葉粉末10gに対し20mLのRNA抽出バッファー (8M塩酸グアニジン、20mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、20mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、50mM メルカプトエタノール)と8mLのTE溶液 (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA)で飽和したフェノールと2mLのクロロホルムを加えよく攪拌し、遠心 (10000g)して上清を回収する。上清に対して0.2倍容量の1M酢酸と0.7倍容量のエタノールを加え-20℃で静置した後、遠心 (10000g)する。沈殿を2mLのTE溶液に溶解し、500mLの10M塩化リチウム溶液を加え、0℃

で2時間静置し、遠心する。沈殿を70%のアルコールで洗浄した後、風乾し、全RNA標品を得た。この全RNAをプロメガ社製Poly A Tract System 1000 を用いて全RNAからmRNAのみを精製した。このmRNAを鋳型としてファルマシア社製cDNAダイレクションクローニングキットを用いて二本鎖cDNAを合成。これらをファルマシア社のプロトコールに従ってラムダgt11発現ベクターのEcoRI-NotI制限酵素サイトに組み込んだのち、ラムダパッケージングキット（ファルマシア社）を用いてライブラリーを完成させた。

【0009】作成したアラビドプシスcDNAライブラリーを組み込んだラムダファージがプレート（10cmx14cm）一枚につき約4万個のブラークが得られる容量を、予め0.5ccmLの10mMの硫酸マグネシウム溶液で懸濁しておいた大腸菌1090株に懸濁して感染させ、選択するための薬剤である50mg/Lのアmpiシリン酸ナトリウムLB寒天培地（1Lに対して10gトリプトン、10g塩化ナトリウム、5gイーストエキストラクト、15g寒天）に展開し、37℃で培養する。ブラークが約2mmになった時点でニトロセルロース膜（S&S社製）に写し取り、変性液（0.2M NaOH, 1.5M NaCl）に浸した濾紙（ワットマン3MM）上に5分、中和液（0.4M Tris-HCl, pH7.5, 2xSSC）に浸した濾紙上で5分間静置した後、2xSSC溶液に5分間浸し、濾紙上で20分間風乾する。

【0010】80℃で120分乾燥させ、ブラークDNAをニトロセルロース膜に固定する。ニトロセルロース膜（10cmx14cm）1枚につき2mLのハイブリダイゼーションバッファー（6xSSC, 0.05% skim milk）に浸し60℃で2時間保温した後、100℃10分間加熱し、急冷によって変性させたERF3のプローブを含む新しいバッファーと交換し、60℃で12時間保温した。その後、フィルター1枚につき5mLの0.1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を含む2xSSC溶液で15分、0.1%のSDSを含む0.5xSSCで15分、0.1%のSDSを含む0.2xSSCで15分洗浄し、X線フィルムに感光させた。ERF3のプローブが結合したブラークを寒天プレートから単離し、1mLのファージバッファー（10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgSO4）に懸濁し、ファージを回収した後、上記のスクリーニングを3回繰り返し、単一ブラークを得た。このブラークを再び大腸菌に感染させ増幅して、ファージよりDNAを抽出し、cDNA領域を制限酵素EcoRIとNotIを用いて切り出した。このDNA断片をプラスミドpT7D3（ファルマシア社）の制限酵素EcoRI-NotI部位に組み込み、プラスミド塩基配列の解析をおこなった。配列番号1に示すAtERF3のcDNAの全長配列を持つプラスミドをpAtERF3と名付けた。

【0011】AtERF3リプレッションドメインの同定エフェクタープラスミドの構築

（AtERF3全長を含むエフェクタープラスミドpGAL4DB-AtERF3の構築：図1）クローンテック社製（Clontech社、U

SA）のプラスミドpBI221を制限酵素XhoIとSstIで切断し、T4ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動でGUS遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下CaMV35S）とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域（Nosターミネーター、以下Nos-ter）を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。クローンテック社製のpAS2-1ベクターを制限酵素HindIIIで消化し、酵母 GAL4タンパク質のDNA 結合領域（1-147 アミノ酸残基）をコードする 748 bp の DNA 断片（以下GAL4DBD）をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をした。このGAL4DBDを含むDNA断片を、先ほどの35S-NosのDNAの35SプロモーターとNosターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質のDNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜してp35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

【0012】AtERF3のcDNAプラスミドpAtERF3とGAL4DBDと読み枠（フレーム）が一致するように設計した5末アッパープライマーprimer1（配列番号3：AtERF3塩基配列1-20に結合）GATGAGGAGAGGAAGAGGCTCと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマーprimer2（配列番号4：AtERF3塩基配列651-678に結合）GTCGACTTAGAGACGTAGATCGGTACAGTGAAGを用いてAtERF3全タンパク質コード領域（配列番号1：AtERF3塩基配列1-678；アミノ酸配列1-225）をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94℃1分、アニール反応47℃2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このAtERF3をコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGALDB-AtERF3を構築した。このエフェクタープラスミドpGALDB-AtERF3を構築する手順を図1に示した。

【0013】（AtERF3アミノ酸166/225を含むエフェクタープラスミドpGAL-166/225AtERF3の構築）pAtERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマーprimer3（配列番号5：結合部位AtERF3塩基配列495-518）TCCGGAGGATTGTCACAGCGATTGと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマーprimer2（配列番号4：結合部位AtERF3塩基配列 651-678）GTCGATTAGAGCGTAGATCGGTACAGTGAAGを用いてAtERF3のアミノ酸配列166/225コード領域に該当する塩基配列496-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このAtERF3のアミノ酸配列166/225にをコードするDNA断片（DNA領域496-678）を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エ

フェクタープラスミドpGAL-166/225AtERF3を構築した。

【0014】(レポーター遺伝子の構築：図2及び図3) プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221(クローンテック社)を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter(nopaline synthase terminator)を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA1(配列番号6) AGCTTAGATCTGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTG及びDNA2(配列番号7) GATCCAGCGTGCTCTCCAAATGAAATGAACCTTCCTTATATAGAGGAAGGCTCTGCAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【0015】このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなう。ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクターPGV-CS2(東洋インキ社製)を制限酵素XbaIとNcoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUCリポーター遺伝子を構築した。酵母のGAL4タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミドpG5CAT(Clontech社製)を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなった後、5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUCベクターを制限酵素BglIIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなう。この部位に平滑末端化した5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片を挿入し、得られたプラスミドのうちGAL4タンパク質のDNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUCを構築した。(図3参照)

【0016】(リファレンス遺伝子の構築) ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセットベクターpRL-nullを制限酵素NheIとXbaI制限酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理を行った後、アガロースゲル電気泳動でウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含む948 bpのDNA断片を精製する。このDNA断片をエフェクタープラスミドの構築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS遺伝子があった領域に挿入する。得られたプラスミ

ドのうち、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子が順方向に向いているものを選抜する(pPTRLの構築)。

【0017】(レポーター遺伝子の活性測定法) タバコ培養細胞プロトプラストにリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入し、エフェクターの効果のリポーター遺伝子の活性を測定することによって調べた。

(プロトプラストの調製法) 100 mLのMS培地(ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、日本製薬社製、3%シヨ糖、0.2 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L m-inositol, 2 mg/L glycine, 1 mg/L 塩酸チアミン、0.2 mg/L 2, 4-D, pHを5.8に調節する)に7日間培養したタバコ培養細胞BY-2の前培養液3 mLを加えて26℃で3日間暗所で培養した細胞を金属製のメッシュ(目の開きが125 µm, 東京スクリーン社製)濾過回収し、0.4 M マニトールを含むMS培地で細胞を洗浄する。洗浄した細胞を25 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地に懸濁して10分間室温で放置3,000 rpmで1分間遠心して細胞を回収する。この細胞を20 mLの1%セルラーゼ(オノヅカRS)と0.1%ペクトリアーゼY-23(セイシン社製)を含むMS培地に細胞を再懸濁して、26℃で90分間暗所で60 rpmで回転振とうしながら細胞壁を消化する。その後、1,000 rpmで5分間遠心してプロトプラストを回収する。

【0018】(エレクトロポレーションによる遺伝子導入) 上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mLになるようにエレクトロポレーション緩衝液(5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール)に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット(ジーンパルサーキュベット0.4 cm electrode, バイオラッド社製)に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-AtERF3あるいはそのデレーションシリーズ(pGALDB-1/25AtERF3~pGALDB-204-225AtERF3)のDNAを各10 µgとリファレンス遺伝子プラスミド1 µgを100 µLの2Xエレクトロポレーション緩衝液(10 mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニトール)を加えて、滅菌水で全量を200 µLにする。キュベットに600 µLのプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター(Genepulser II Electroporation Systemバイオラッド社製)を用いて600 V, 25 mFの条件でDNAを導入する。導入後、キュベットからプロトプラストを1,000 rpmで5分間遠心して回収し、5 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地にプロトプラストを再懸濁して、26℃で6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

【0019】(ルシフェラーゼ活性測定) 6時間静置したプロトプラスト懸濁液を1 mL採取して、2,000 rpmで3分間遠心してプロトプラストを回収した後、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega社製)に添付されているPassive Lysis Buffer 50 µLに懸

濁する。プロトプラストを破碎した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を5 μ l 用いて Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) とルミネッセンスリーダー (BLR-201, アロカ社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activity を測定値として求めた。エフェクターを入れない場合の相対値を100として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果进行调查した。すなわち、pGAL4-LUCリポーター遺伝子とpGALDB-AtERF3エフェクタープラスミドを導入したときのリポーターの活性値を減少させることから、pGALDB-AtERF3は、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果 (リプレッサー機能) があることを示している。以下、リポーターの活性値を測定して、リポーターの相対活性値が100以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能が存在するので、どのエフェクターがリプレッサーとして機能するのかをレポーターの活性を測定することによって調べた。

【0020】 (リプレッサードメインの同定) アラビドプシスAtERF3の遺伝子の転写制御に関わる機能を解析するため、リポーター遺伝子pGAL4-LUCとpGALDB-AtERF3をタバコ培養細胞より調整したプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、リポーター遺伝子の活性を調べた。その結果、pGAL-AtERF3エフェクターは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子の場合 (コントロール) に比べ80%に減少させた。対照実験としておこなったAtERF3のコード領域を含まないp35S-GALDBDは、リポーター遺伝子の活性に影響を及ぼさなかった。このことは、AtER

SEQUENCE LISTING

<:110>:Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<:120>:Novel repression domain of plant specific transcription factor

<:130>:

<:160>: 7

<:210>: 1

<:211>: 678

<:212>: DNA

<:213>: Arabidopsis thaliana

<:400>:1

F3が転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

【0021】 次に、AtERF3遺伝子のタンパク質コード領域をディリーションしたDAN断片もつエフェクタープラスミド、pGAL-166/225AtERF3が、リポーター遺伝子の活性を抑制する機能をもつかを調べた。pGAL-166/225AtERF3エフェクタープラスミドをリポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞に導入し、リポーター遺伝子の活性を測定した結果、pGAL-166/225AtERF3エフェクターは、pGALDB-AtERF3を導入した場合と同様に、レポーター遺伝子の活性をコントロールに比べ、約50%に抑えるリプレッサー機能があることが示された。(図4B)。この結果から、AtERF3のリプレッサー機能を持つ領域 (リプレッションドメイン) は、AtERF3のアミノ酸配列、166/225に存在することを明らかにした (図4B)。この60アミノ酸からなる領域のアミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0022】 本発明の遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドは、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合するDNA結合タンパク質と融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。また、リプレッサー機能は調べたところ遺伝子に非特異的であるが、DNAとの結合が必要であることから、特定のDNAに結合するDNA結合ドメインと融合することにより、遺伝子特異的あるいは非特異的に転写を抑制することが可能となる。このことによって、例えば色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することが可能となり、これまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することができる。また、アレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制することによって、アレルゲンの少ない食物の生産も可能となる。

【0023】

【配列表】

atg agg aga gga aga ggc tct tcc gcc gtc gcc gga cct acc gtc gtt	48
Met Arg Arg Gly Arg Gly Ser Ser Ala Val Ala Gly Pro Thr Val Val	
5 10 15	
gcc gcc atc aac gga tct gta aaa gaa atc aga ttc aga ggc gta agg	96
Ala Ala Ile Asn Gly Ser Val Lys Glu Ile Arg Phe Arg Gly Val Arg	
20 25 30	
aag aga cct tgg gga cga ttc gca gct gag atc cgt gat cca tgg aaa	144
Lys Arg Pro Trp Gly Arg Phe Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Trp Lys	
35 40 45	
aaa gct cgt gtt tgg tta ggt act ttc gat tcc gcc gaa gaa gct gct	192
Lys Ala Arg Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Ser Ala Glu Glu Ala Ala	
50 55 60	
cgc gct tac gac tcc gcc gct cgt aac ctc cgt ggt cct aaa gcc aaa	240
Arg Ala Tyr Asp Ser Ala Ala Arg Asn Leu Arg Gly Pro Lys Ala Lys	
65 70 75 80	
act aat ttc ccc atc gat tct tct tct cct cct cct cct aat ctc cga	288
Thr Asn Phe Pro Ile Asp Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Asn Leu Arg	
85 90 95	
ttt aat cag att cgt aat caa aat caa aac caa gtc gat ccg ttt atg	336
Phe Asn Gln Ile Arg Asn Gln Asn Gln Asn Gln Val Asp Pro Phe Met	
100 105 110	
gac cac cgg tta ttc acc gac cat caa caa cag ttc ccg att gtt aac	384
Asp His Arg Leu Phe Thr Asp His Gln Gln Gln Phe Pro Ile Val Asn	
115 120 125	
cgg cct act agt agc agc atg agc agc acc gtt gaa tcg ttt agc gga	432
Arg Pro Thr Ser Ser Ser Met Ser Ser Thr Val Glu Ser Phe Ser Gly	
130 135 140	
ccc aga cct acg acg atg aaa ccg gcc acg acg aag aga tat cct aga	480
Pro Arg Pro Thr Thr Met Lys Pro Ala Thr Thr Lys Arg Tyr Pro Arg	
145 150 155 160	
act cca ccg gtt gtt ccg gag gat tgt cac agc gat tgc gat tcg tcg	528
Thr Pro Pro Val Val Pro Glu Asp Cys His Ser Asp Cys Asp Ser Ser	
165 170 175	
tcg tct gta atc gac gac gac gac gat atc gca tcg tct tca ccg cga	576
Ser Ser Val Ile Asp Asp Asp Asp Asp Ile Ala Ser Ser Ser Arg Arg	
180 185 190	
cgg aat ccg ccg ttt caa ttc gat ctt aat ttt cca ccg ttg gat tgt	624
Arg Asn Pro Pro Phe Gln Phe Asp Leu Asn Phe Pro Pro Leu Asp Cys	

205

```
<:210>: 5
<:211>: 24
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence
```


<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 5

tccggaggat tgtcacagcg attg

<:210>: 6

<:211>: 65

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 6

agcttagatc tgcaagaccc ttctctata taaggaagt catttcattt ggagaggaca

10 20 30 40 50 60

cgctg

65

<:210>: 7

<:211>:

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 7

gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgcag

10 20 30 40 50 60

atcta

65

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpBI221からpGAL4DB-AtERF3を構築する手順を示す図である。

【図2】レポーター遺伝子GAL4-LUCを構築する手順の前半部を示す図である。

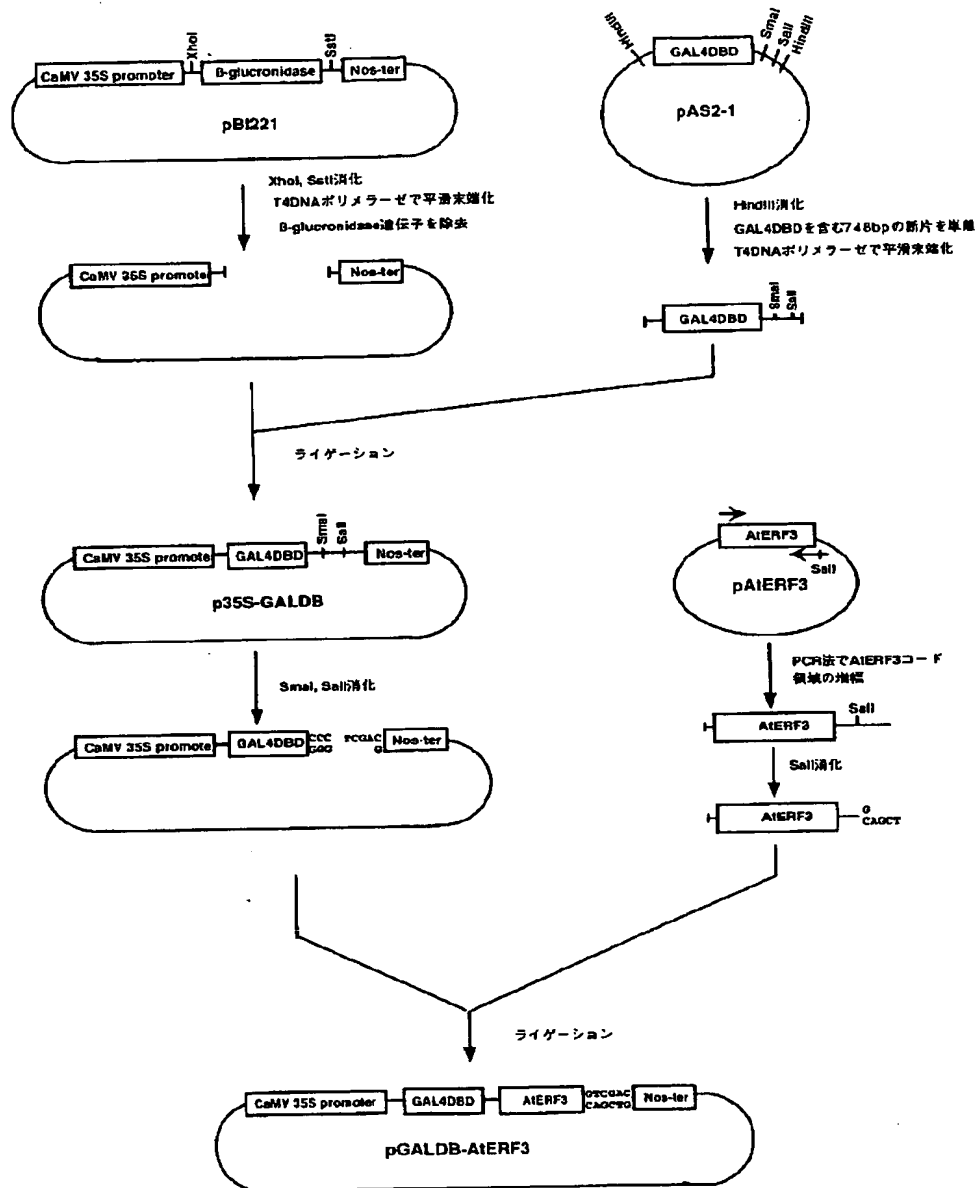
【図3】図2に引き続きレポーター遺伝子GAL4-LUCを構築する手順の後半部を示す図である。

【図4】Aはリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。図において、5XGAL4: GAL4転写因子DNA結合配列、TATA: CaMV35SプロモーターTATAボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス35Sタンパク質遺伝子プロモーター、GAL4 DB: 酵母GAL4転写因子DNA結合ドメイン

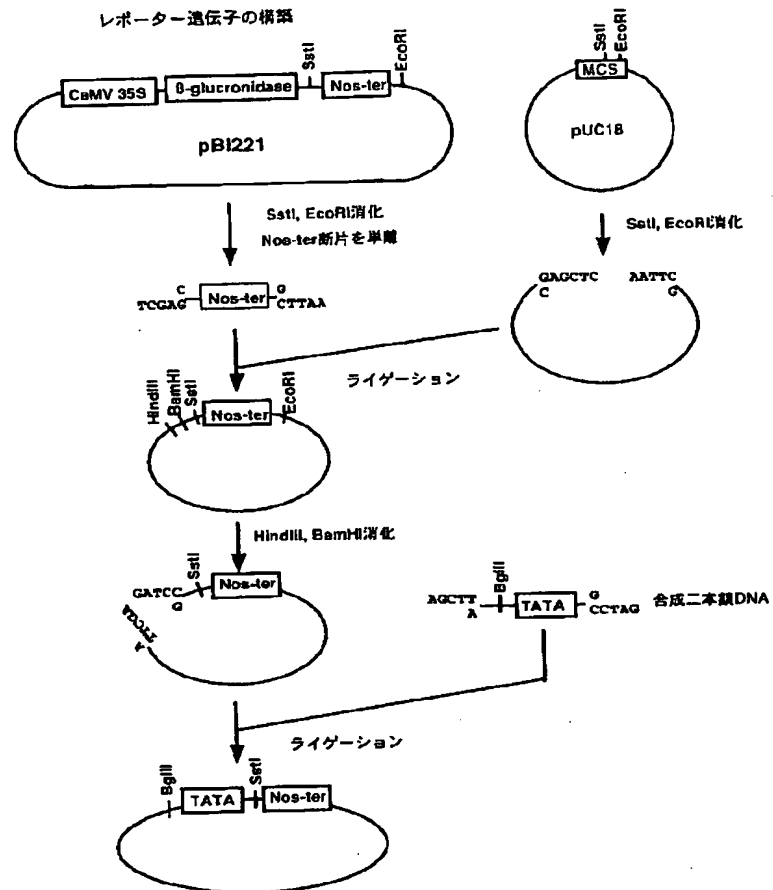
ンコード領域、Nos: ノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。BはAtERF3およびAtERF3のディリーションがリポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす影響を示す図である。図において、左の数字(166/225)は、AtERF3のアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を100とした。AtERF3およびAtERF3ディリーションのエフェクターでアミノ酸配列166/225を持つエフェクターがリポーター遺伝子の活性を50%に減少させ、転写を抑制する効果を持つことが示されている。

【図1】

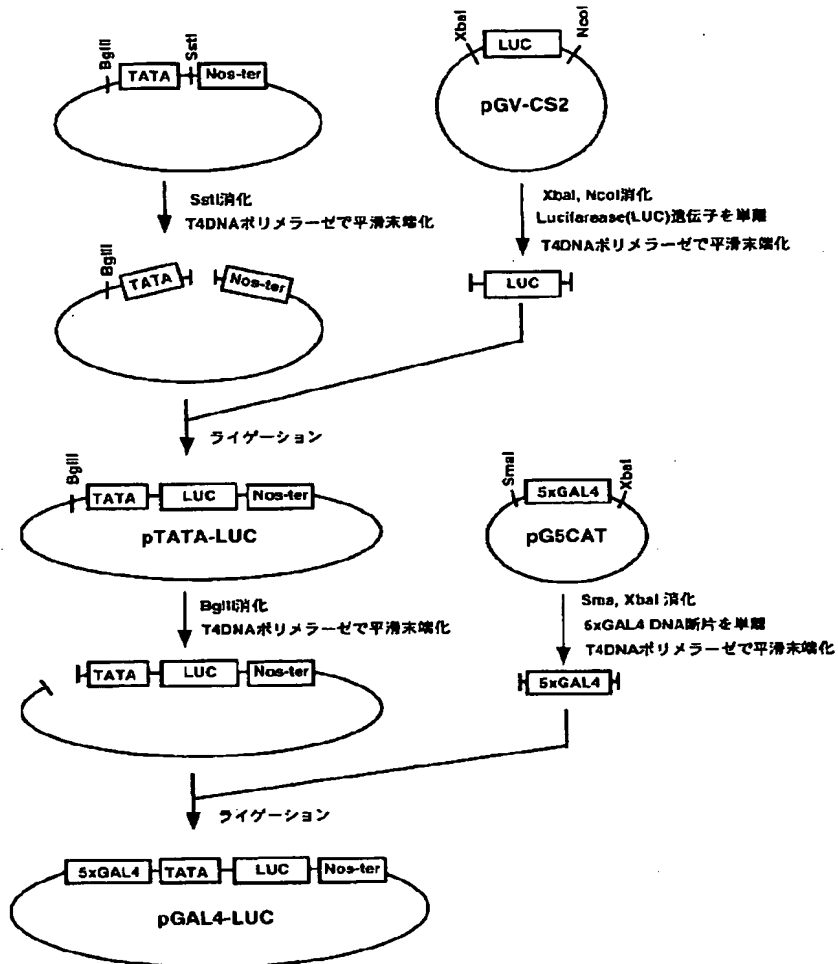
エフェクタープラスミドの構築



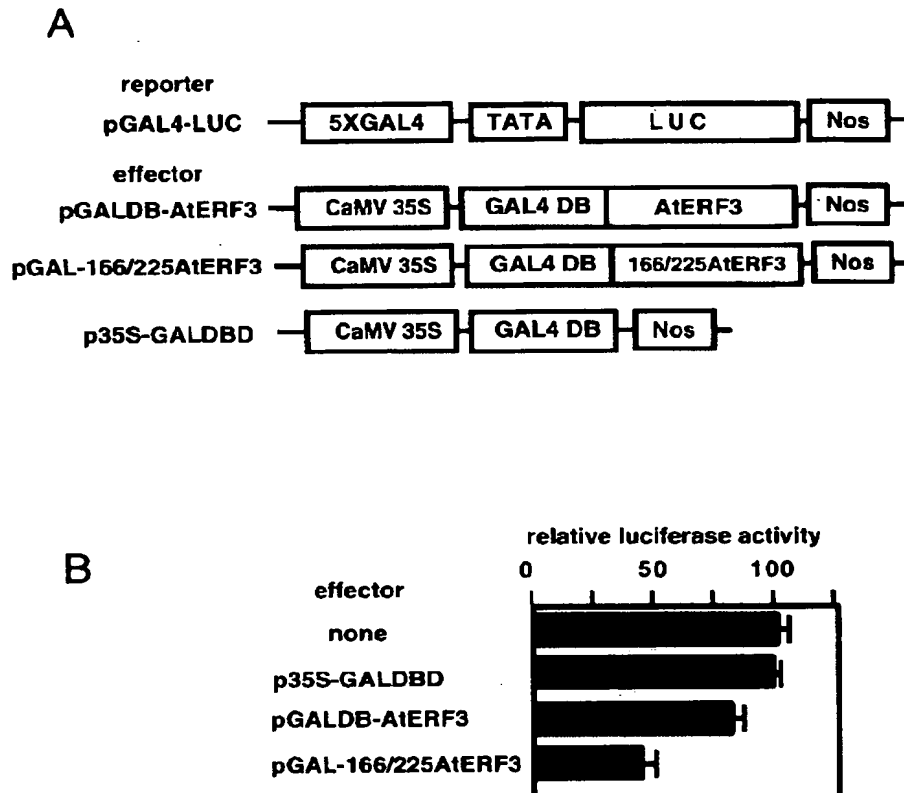
【図2】



【図3】



【図 4】



【手続補正書】

【提出日】平成12年4月11日（2000. 4. 11）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】（レポーター遺伝子の構築：図2及び図3）プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221（クローンテック社）を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter（nopaline synthase terminator）を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA1（配列番号6）AGCTTAGATCTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTG及びDNA2（配列番号7）GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAAGTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱

した後、60℃で1時間加熱し、その後室温（25℃）で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】（エレクトロポレーションによる遺伝子導入）上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mLになるようにエレクトロポレーション緩衝液（5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール）に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット（ジーンパルサーキュベット 0.4 cm electrode, バイオラッド社製）に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-AtERF3あるいはそのデレーションシリーズ（pGALDB-1/25AtERF3~pGALDB

-204-225AtERF3) のDNAを 各10ugと リファレンス遺伝子プラスミド1ugを 100 uL の 2X エレクトロポレーション緩衝液 (10 mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニトール) を加えて、滅菌水で全量を 200 uL にする。キューベットの 600uL のプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター (Genepulser II Electropor

ation System/バイオラッド社製) を用いて 600 V, 25 mF の条件で DNA を導入する。導入後、キューベットからプロトプラストを1,000 rpm で5分間遠心して回収し、5 mL の 0.4 M マニトールを含む MS 培地 にプロトプラストを再懸濁して、26°Cで6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ターマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/02		5/00	C

F ターム (参考)

2B030	AA02 AB03 AD08 AD20 CA06
	CA17 CA19 CB03 CD03 CD07
	CD10
4B024	AA01 AA05 AA08 AA20 BA80
	CA04 DA01 EA04 FA02 GA14
	GA17 GA21 HA01 HA17
4B064	AG01 BA12 BA14 CA11 CA19
	CC24 DA01 DA10 DA11 DA20
4B065	AA88X AA88Y AA89X AB01
	AC14 BA03 BA10 CA24 CA41
	CA44 CA53
4H045	AA10 BA10 BA20 CA30 EA01
	EA05 EA28 FA72 FA74 HA04
	HA05

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.